固相抽出および液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) 法による牛乳中の含有サルファ剤の定量

アプリケーションノート

製薬

著者

Carol A. Gonzalez and Karyn M. Usher
Department of Chemistry
West Chester University
West Chester, PA 19383
USA

Anne E. Brooks and Ronald E. Majors
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

概要

Agilent サンプリーク高分子強カチオン交換樹脂 (SCX) カートリッジを使用して、牛乳サンプルに含まれる 9 種類の微量な含窒素サルファ剤 (スルファメトキサゾール、スルファジアジン、スルファチアゾール、スルファメラジン、スルファメチゾール、スルファメタジン、スルファメトキシピリダジン、スルファクロロピリダジン、およびスルファジメトキシン) の固相抽出法を検討しました。サルファ剤の分離および定量には Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MSシステムを使用しました。逆相クロマトグラフィーには、0.1% のギ酸/アセトニトリル溶液グラジェントで Agilent ZORBAX Eclipse Plus カラム (C18、3.0 mm × 50 mm、1.8 µm) を使用しました。牛乳サンプルからの全体的な回収率は 73 ～ 99 %、相対標準偏差 (%RSD) 値は 10 %以下でした。検出限界は、サルファ剤の種類によって (S/N = 3 で) 牛乳含有濃度 0.2 ～ 2.0 ng/mL の範囲内のレベルとなり、米国食品医薬品局の定める牛乳中の許容含有濃度を下回るレベルでした。

Agilent Technologies

はじめに

スルホンアミド系化合物は、1900 年代初期の抗菌性の発見以降、さまざまな疾病の治療薬として利用されています。酪農業界では、感染症を予防するためにサルファ剤を牛に投与しています。このため、牛に投与したサルファ剤が牛乳中に含まれて消費者の口にまで運ばれる可能性があります。こうした摂取は、のちに治療薬として薬剤が投与されても薬効のなくなる薬剤耐性を生む原因となります [1、2]。

一般にはサルファ剤として知られるスルホンアミド系化合物は、Gerhard Domagk による 1929 年の発見以降、有効な抗菌剤として利用されてきました。現在、感染症の予防薬としてはサルファ剤よりも β-ラクタム抗生物質の方が遙かに一般的になっていますが、安価な薬剤であることから、サルファ剤は依然として世界各地で日常的に使用されています。年を追うごとに、これらの化合物に対する耐性を持つ微生物が増えてきています。そのため、動物から人間への感染力を持つ薬剤耐性細菌の出現が強く懸念されています。こうした化合物に対する耐性を生み出している主な原因には、病気の予防を目的として少量の抗菌剤を動物の飼料に混ぜ続けているということがあります。1990 年代、米国食品医薬品局 (FDA) は乳製品の検査を開始しました [3]。乳牛にサルファ剤が与えられている場合、微量のサルファ剤が牛乳の中に混入して一部の消費者にアレルギー反応を引き起こす恐れがあり、薬剤耐性微生物を増やす原因にもなります。本アプリケーションノートでは、牛乳から 9 種類の主要なサルファ剤を検出できる万全な対策メソッドを示します。分析の対象となるサルファ剤は、スルファメトキサゾール、スルファジアジン、スルファチアゾール、スルファメラジン、スルファメチゾール、スルファメタジン、スルファメトキシピリダジン、スルファクロロピリダジン、およびスルファジメトキシンです (それぞれの構造式と化学特性については図 1 を参照してください)。

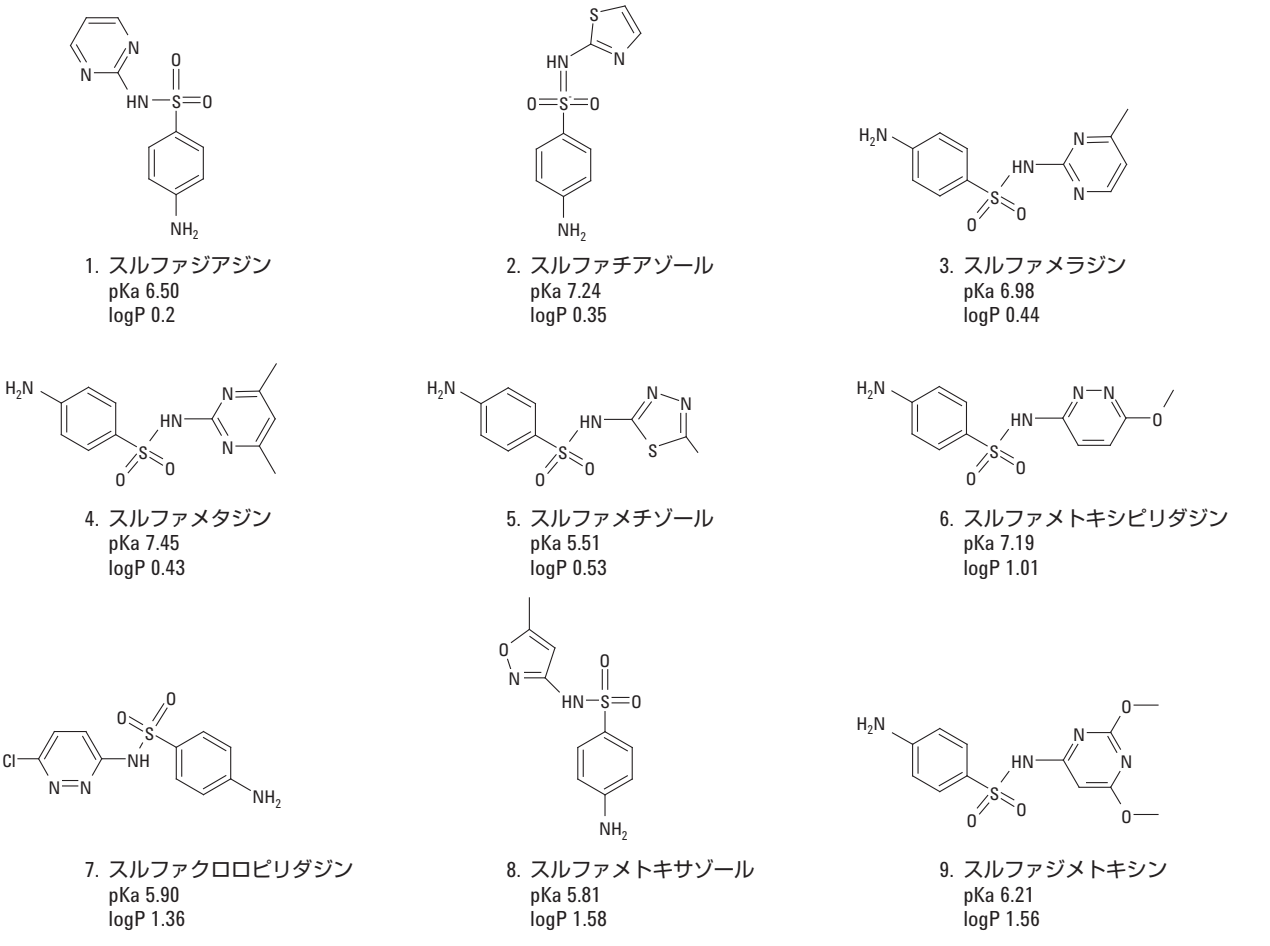

図 1.　本調査で使用した各サルファ剤の化学構造と化学定数

実験

材料と化学薬品

水 (ニュージャージー州ギッブスアウンの EMD Chemicals 社から購入)、アセトニトリル、およびメタノール (ミシガン州マスケガンの Burdick and Jackson 社から購入) は HPLC グレードの製品です。サルファ剤は、Sigma-Aldrich 社 (ミズーリー州セントルイス) から分析グレードの製品を購入しました。原液は、購入したサルファ剤を 25 mL のメタノールで希釈した (濃度 1.19 mg/mL 以下の) 混合溶液で、最長 14 日間冷凍保存されたものです。作業用の溶液は、原液を水で希釈して毎日調製しました。

固相抽出 (SPE) カートリッジは、Agilent サンプリーク SCX、3 mL/60 mg (部品番号 5982-3236) の高分子カチオン交換樹脂 (平均粒径 30 µm) です。分析に使用したシステムは、Agilent 1200 シリーズ HPLC システムに 6410 トリプル四重極質量分析計 (+ エレクトロスプレイーイオン源) をつなげたものです。分析用カラムは、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム、3.0 mm × 50 mm (部品番号 959941-302) です。ギ酸は、J.T. Baker 社 (ニュージャージー州フィリップスバーグ) から (Baker PCS 試薬、90%) を購入し、移動相の調製剤および牛乳タンパクと脂質の沈殿剤として使用しました。

サンプル調製

全乳 1 mL ごとに 20 µL の 45% ギ酸水溶液 (10 mL の 90% ギ酸溶液と 10 mL の水を混ぜて調製した水溶液) を加えてタンパク質と脂質を沈殿させました。その後、牛乳サンプルを遠心分離器 (Eppendorf 5810R 15 amp、ニューヨーク州ウェストバリー) にかけて 8000 rpm で 10 分間遠心分離しました。遠心分離は、3500 rpm で 20 分間でも構いません。上澄み液 (調製全乳抽出液) の一定量を採取してサンプリーク SCX カートリッジに負荷しました。

固相抽出 (SPE) による精製

図 2 の手順に従って SPE カートリッジのコンディショニングと平衡化を行ったのち、調製全乳抽出液をカラムに 5 mL 負荷しました。全乳抽出液をカラムに負荷するときには流量が 1.5 mL/min を超えないよう注意します。乾燥処理においては、カートリッジを水銀柱 15 mm の真空圧で所定の時間だけ乾燥させました。溶出液は窒素気流下で蒸発乾固させ、1 mL の溶媒 (水とメタノールの混合比 9:1 の溶液) で再溶解しました。その後、サンプルを超音波洗浄器 (Branson 1200、コネチカット州ダンバリー) に 5 分間かけてから Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MS システムで分析しました。

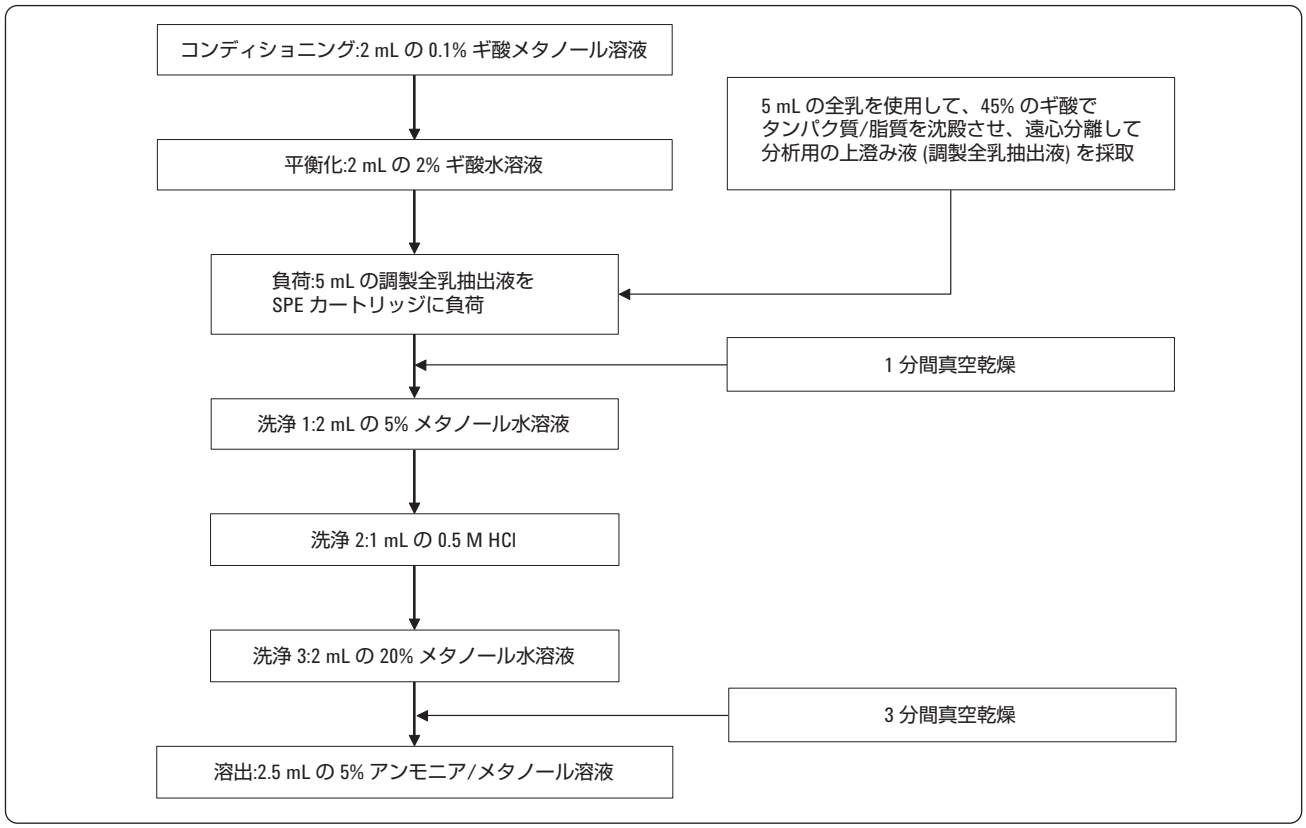

図 2. 固相抽出の手順

分析するサルファ剤の濃度が低く、かつ Agilent 6410 トリプル四重極 LC/MS システムでの検出限界濃度が極めて低いことから、SPE マニホールド装置は、サンプルの汚染を防ぐために特に注意を払ってきれいな状態に維持しておく必要があります。マニホールド装置は、使用するたびに洗浄するか、オプションが利用できるなら、ニードル挿入装置を新しくインストールすることができます。

分離と分析

クロマトグラムと MS/MS に関する実験設定値を表 1、2、および 3 に示します。

表1.　HPLC の設定

カラム	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18、3.0 x 50 mm、1.8 µm (部品番号 959941-302)			
流量	0.42 mL/min			
カラム温度	35 °C			
注入量	1.7 µL + ニードル洗浄 (MeOH/H_2O (混合比 5:1) を用いてフラッシュポートで 30 秒間洗浄)			
移動相	A:H_2O/アセトニトリル混合液 (混合比 9:1) + 0.1% のギ酸 B:0.1% のギ酸アセトニトリル溶液			
分析時間	8 min			
ポストタイム	3 min			
グラジエント	時間	0	3.5	8
	%B	0	0	65

表 2.　MS/MS 条件

T_R (分)	化合物名	プリカーサイオン	プロダクトイオン
1.69	スルファジアジン	251.2	156.0 108.0
1.93	スルファチアゾール	256.1	156.0 108.0
2.41	スルファメラジン	265.2	156.0 108.0
3.44	スルファメタジン	279.2	186.1 124.1
3.89	スルファメチゾール	271.1	156.0 108.0
4.10	スルファメトキシピリダジン	281.2	156.0 108.0
5.99	スルファクロロピリダジン	285.1	156.0 108.1
6.42	スルファメトキサゾール	254.2	156.1 108.1
7.17	スルファジメトキシン	311.2	156.0 108.0

表 3.　エレクトロスプレーイオン源に関する条件

ガス温度	350 °C
ガス流量	12 L/min
噴霧器	40 psi
キャピラリ	4000 V

結果と検討

直線性と検出限界値

外部検量線を作成するために使用した溶液は、原液にマトリックスブランクを添加する形で調製しました。マトリックスブランクは、(沈殿、遠心分離、SPE 手順を含めた) 全手順を実行して牛乳から調製しました。検量線の結果を表 4 にまとめます。検量線の回帰式を用いて回収率を算出しました。各サルファ剤についてシグナル/ノイズ比 (S/N) が 3:1 を超える濃度を検出限界としました。各サルファ剤の検出限界濃度を表 4 に示します。

表 4.　各サルファ剤に関する検量線回帰率分析

化合物名	回帰式	R^2	牛乳中の検出限界 (ng/mL)
スルファジアジン	y = 282.62x + 225.59	1.0000	0.4
スルファチアゾール	y = 440.38x + 246.43	0.9996	1.0
スルファメラジン	y = 358.34x + 485.54	0.9998	1.0
スルファメタジン	y = 539.09x + 576.81	0.9989	1.0
スルファメチゾール	y = 499.57x + 333.03	0.9994	2.0
スルファメトキシピリダジン	y = 494.61x + 139.66	0.9970	1.0
スルファクロロピリダジン	y = 343.78x + 92.808	0.9999	2.0
スルファメトキサゾール	y = 260.05x – 351.97	0.9901	2.0
スルファジメトキシン	y = 956.97x + 1420.9	0.9973	0.2

回収率と再現性

このメソッドの回収率および正確さは、牛乳への添加量を変えることによって、2 つの濃度レベル (5 ng/mL と 10 ng/mL の濃度レベル) で決定しました。5 mL の調製牛乳抽出液を SPE カートリッジに負荷して固相抽出を行い、その抽出物を 1 mL の移動相で再溶解しているため、分析試料の濃度は牛乳試料の 5 倍になっています。したがって、分析する溶液の濃度は、5 ng/mL添加した牛乳試料の場合は 25 ng/mL になり、10 ng/mL添加した牛乳試料の場合は 50 ng/mL になります。それぞれの濃度レベルを 5 回調製して分析を行いました。回収率と再現性のデータを表 5 に示します。ブランクのクロマトグラムと、標準添加牛乳抽出液 (5 ng/mL) のクロマトグラムを図 3 に示します。

表 5.　本研究で使用した各サルファ剤の回収率と正確さ

化合物名	牛乳中添加濃度レベル (ng/mL)	回収率	相対標準偏差 (%)
スルファジアジン	5	74.2	8.3
	10	99.7	5.7
スルファチアゾール	5	76.8	4.4
	10	83.2	4.7
スルファメラジン	5	73.2	6.3
	10	84.8	0.6
スルファメタジン	5	78.3	7.5
	10	89.0	3.1
スルファメチゾール	5	78.4	7.0
	10	94.5	5.3
スルファメトキシピリダジン	5	76.3	6.2
	10	86.9	2.2
スルファクロロピリダジン	5	78.3	9.4
	10	84.3	6.0
スルファメトキサゾール	5	74.0	4.3
	10	87.7	6.4
スルファジメトキシン	5	75.4	3.1
	10	82.5	5.4

結論

本研究の結果から、Agilent サンプリーク SCX カートリッジが牛乳などの複雑な試料中の複数のスルホンアミド系化合物に対する有効な精製/濃縮法として利用できることが明らかになりました。SPE による精製後に残留する試料成分は、最小限であったため、サルファ剤の定量に影響しませんでした。定量を行った濃度レベルは、米国食品医薬品局が消費に安全とみなす牛乳中のサルファ剤含有濃度よりも低い値です (10 ng/mL)。このメソッドの検出限界も米国食品医薬品局の許容濃度 (牛乳中 3 ng/mL) を十分に下回っていました。

参考文献

1. G. G. Khachatourians, Canadian Medical Association Journal, 159 (9): 1129, 1998
2. M. K. Glynn, C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. J. Angulo, New England Journal of Medicine, Volume 338 (19): 1333–1339, 1998
3. U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety Applied Nutrition Food Compliance Program Chapter 03 – Foodborne Biological Hazards (10-01-97) http://www.cfsan.fda.gov/~comm/cp03039.html accessed 2/13/09

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

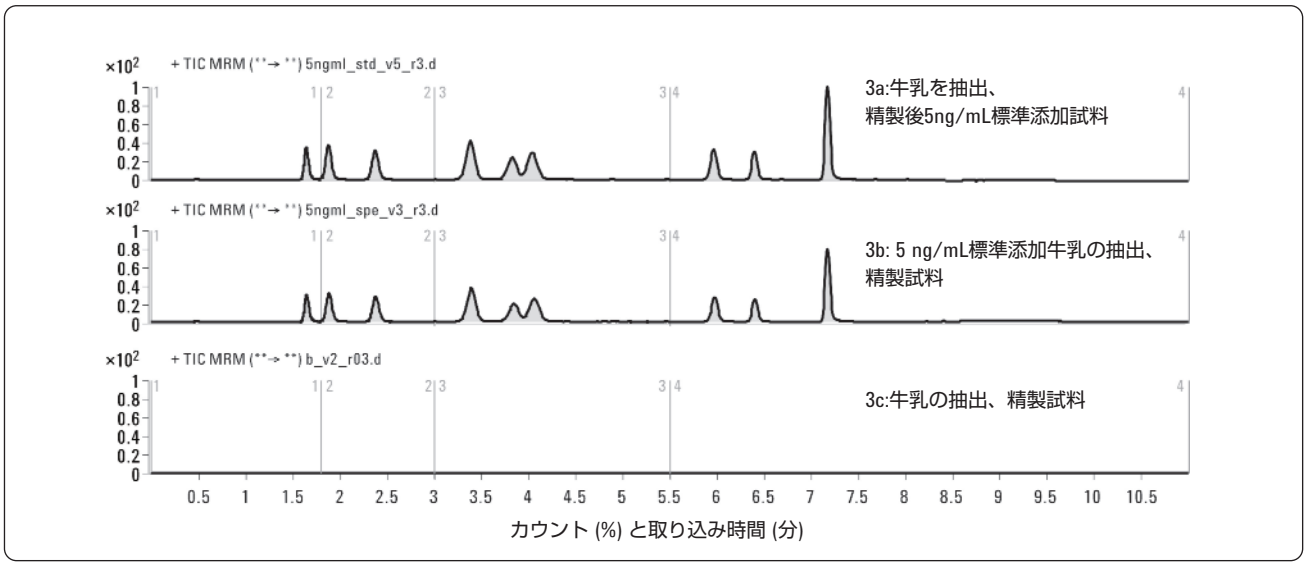
×10² + TIC MRM (**→ **) 5ngml_std_v5_r3.d
3a:牛乳を抽出、精製後5ng/mL標準添加試料
×10² + TIC MRM (**→ **) 5ngml_spe_v3_r3.d
3b: 5 ng/mL標準添加牛乳の抽出、精製試料
×10² + TIC MRM (**→ **) b_v2_r03.d
3c:牛乳の抽出、精製試料
0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 9 9.5 10 10.5
カウント (%) と取り込み時間 (分)

図 3　標準添加牛乳抽出液及び牛乳ブランク抽出液のトータルイオンクロマトグラム。(3a)牛乳ブランク抽出、SPE精製液に5ng/mL相当の標準を添加した試料 (3b) 5 ng/mL相当の標準を添加した牛乳抽出、SPE精製試料 (3c) 牛乳ブランク抽出、SPE精製試料

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
March 11, 2009
5990-3713JAJP

Agilent Technologies